



TITLE:

The Development of a Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cell Model for the Investigation of SCN5A-D1275N-Related Cardiac Sodium Channelopathy(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Hayano, Mamoru

CITATION:

Hayano, Mamoru. The Development of a Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cell Model for the Investigation of SCN5A-D1275N- Related Cardiac Sodium Channelopathy. 京都大学, 2018, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2018-01-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20792>

RIGHT:

許諾条件により本文は2018-08-31に公開

京都大学	博士（ 医学 ）	氏 名	早野 護
論文題目	The Development of a Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cell Model for the Investigation of <i>SCN5A</i> -D1275N- Related Cardiac Sodium Channelopathy (患者由来 iPS 細胞モデルを用いた <i>SCN5A</i> -D1275N 関連心臓ナトリウムチャネル病の病態解明)		
(論文内容の要旨)			
<p><i>SCN5A</i> は電位依存性心臓ナトリウムチャネル α サブユニット (Nav1.5) をコードし、その遺伝子異常により遺伝性 QT 延長症候群、ブルガダ症候群、心臓伝導障害など様々な遺伝性不整脈疾患が引き起こされることが知られている。中でも <i>SCN5A</i>-D1275N 変異は、心臓伝導障害や拡張型心筋症を呈する特徴があるが、これまでの解析では、実験系によって異なる結果が報告されており、ヒトにおける疾患発症メカニズムは未だ解明されていない。</p> <p><i>SCN5A</i>-D1275N 変異チャネルの電気生理学的特性を解析するため、初めにヒト胎児腎由来 HEK293 細胞にチャネル蛋白を過剰発現させた系を用いてナトリウムチャネル電流記録を行った。D1275N 変異チャネルの最大コンダクタンスは野生型と変わらず、チャネルキネティクスの解析では、定常状態活性化ゲートが 10 mV 脱分極へシフトしていた。次に、ヒト心筋モデルとして、ヘテロ D1275N 変異を有し心臓伝導障害を呈する 24 歳女性からヒト多能性幹細胞 (human induced pluripotent stem cell: hiPSC) を作成し、分化心筋の解析を行った。胚様体の拍動頻度は健常人由来コントロールと比較して患者由来分化心筋で有意に低下していた (D1275N: 42 ± 4 bpm, Control: 101 ± 4 bpm; $P < 0.001$)。次に、フローサイトメーターを用いたソーティングにて心筋の精製を行い、約 90% の高純度心筋細胞を用いて遺伝子発現解析を行ったところ、<i>SCN5A</i> の mRNA 量は両群で差を認めなかったが、Nav1.5 蛋白発現量 (細胞全体、膜分画) は D1275N-hiPSC 由来分化心筋で約半分に低下しており (細胞全体; D1275N: 0.59 ± 0.03, Control: 1.10 ± 0.04; $P < 0.05$; 膜分画; D1275N: 0.52 ± 0.07, Control: 1.18 ± 0.35; $P < 0.05$)、プロテアソーム阻害薬である MG132 処理により、低下していた D1275N 分化心筋のチャネル蛋白発現が細胞全体、膜分画とも改善した。以上の結果より、D1275N-hiPSC 由来分化心筋では、Nav1.5 がユビキチネーション促進により減少していることが示唆された。さらに、パッチクランプ法を用いた活動電位記録では、D1275N-hiPSC 由来分化心筋において立ち上がり最大加速度の低下を認め (D1275N: 12.6 ± 1.2 mV/ms, Control: 26.2 ± 5.7 mV/ms; $P < 0.01$)、ナトリウムチャネル電流記録では、最大コンダクタンスの低下を認めた (D1275N: 2.31 ± 0.33 S, Control: 3.53 ± 0.35 S; $p < 0.05$)。また、Ca²⁺ transient 記録では、心筋収縮力に関連する、振幅、取り込み最大加速度、90%減衰時間において、両群で有意な差を認めなかった。</p> <p>本研究において、<i>SCN5A</i>-D1275N 患者由来 hiPSC 分化心筋においてナトリウムチャネルコンダクタンスの低下、Nav1.5 蛋白発現量の低下を認め、これらの Nav1.5 機能低下は、患者の心臓伝導障害に合致する所見と考えられた。また、そのメカニズムにチャネル蛋白のユビキチネーション促進が関与していることを示した。今後、本 hiPSC モデルを用いた <i>SCN5A</i>-D1275N 関連心臓ナトリウムチャネル病の更なる疾患発症機序解明、治療法開発への応用が期待される。</p>			

<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p><i>SCN5A</i>-D1275N 変異チャネルの電気生理学的特性を解析するため、ヒト心筋モデルとして、ヘテロ D1275N 変異を有し心臓伝導障害を呈する 24 歳女性からヒト多能性幹細胞 (hiPSC) を作成し、分化心筋の解析を行った。遺伝子発現解析を行ったところ、<i>SCN5A</i> の mRNA 量は両群で差を認めなかったが、Nav1.5 蛋白発現量 (細胞全体、膜分画) は D1275N-hiPSC 由来分化心筋で約半分に低下しており、プロテアソーム阻害薬である MG132 処理により、低下していた D1275N 分化心筋のチャネル蛋白発現が細胞全体、膜分画とも改善した。以上の結果より、D1275N-hiPSC 由来分化心筋では、Nav1.5 がユビキチネーション促進により減少していることが示唆された。さらに、パッチクランプ法を用いた活動電位記録では、D1275N-hiPSC 由来分化心筋において立ち上がり最大加速度の低下を認め、ナトリウムチャネル電流記録では、最大コンダクタンスの低下を認めた。D1275N-hiPSC を用いた本研究の結果は、患者の心臓伝導障害に合致する所見と考えられた。以上の研究は <i>SCN5A</i>-D1275N 関連心臓ナトリウムチャネル病の更なる疾患発症機序の解明に貢献し、治療法開発への応用に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 29 年 10 月 3 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
--